



TITLE:

家兔脾臓の蛋白分解酵素作用の研究(第二報). 家兔脾液の蛋白分解酵素作用の研究

AUTHOR(S):

市岡, 冬太郎

CITATION:

市岡, 冬太郎. 家兔脾臓の蛋白分解酵素作用の研究(第二報). 家兔脾液の蛋白分解酵素作用の研究. 化学研究所講演集 1936, 6: 72-77

ISSUE DATE:

1936-06

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/73581>

RIGHT:

家兔膵臓の蛋白分解酵素作用の研究 (第二報)

家兔膵液の蛋白分解酵素作用の研究

醫學士 市岡冬太郎

豚膵浸出液に就いて Waldschmidt-Leitz 氏⁽¹⁾は Proteinase, Dipeptidase, Aminopolypeptidase, Carboxypolypeptidase 等を分別報告し、最近 Northrop 氏⁽²⁾結晶 Trypsin に關する研究を公表して居る。著者は第一報*に於いて、家兔膵臓潰浸液に關する研究を報告したが、これ等は何れも膵臓浸出液の研究に過ぎない、茲に消化生理上第一義と考ふ可き膵液自體の酵素作用研究の等閑に付せられ居るを遺憾とし、殊に醫學試驗動物として廣く使用される家兔膵液の研究に着手した。

腺浸出成分は必ずしも腺分泌成分と同一と斷言出来ない、殊にその活性狀態など問題になる場合には非常に趣を異にするかも知れない。著者の家兔膵潰浸液に就いて觀察したる所は既に活性 Trypsin 作用を認め又 Erepsin 作用を證明した。

膵液の蛋白分解酵素作用に關する報文を見るに、犬膵液 (Pankreasfistelsaft) に就いて、E. Waldschmidt-Leitz 氏等⁽³⁾は Trypsin 作用及び Erepsin 作用を公にし、最近 Le Breton 氏等⁽⁴⁾は犬膵液中に非活性 Trypsin (inaktives Trypsin) 及び活性 Carboxypolypeptidase を證明するも、Peptidase 作用の存在は之を否定して居る。

又河合氏は⁽⁵⁾犬膵液中に Benzoyl-glycyl-dl-phenylalanin, Benzoyl-dl-leucylglycin の分解能を認め、Grübler 製 Trypsin 製劑に就いても同様結果を觀察した。

著者は家兔膵管より膵液を採集し、處理せざる即非賦活膵液又小腸粘膜 Kinase にて處理したる賦活膵液に就いて實驗を行つた。

1) 種々蛋白を以つて行へる非賦活膵液に依る水解能試験は全部陰性を示し、賦活膵液は著明に分解能を發揮し、PH 7.5—8.0 附近に至適水素イオン濃度を認めた。Methylcasein が Casein に比し分解値の低下せるは、今井氏⁽⁶⁾が豚小腸蛋白分解酵素に就いて觀察せる結果と一致して居る。即アミノ基被覆は膵液酵素に對して抵抗となるのである。Albumin 類が賦活液でも分解陰性成績を示したのは意外である。使用基質は E. Merck 製劑にして、その性狀に不明の點多きため、今後自製材料で試験した結果を考へたい。

使用 Pepton は特に Casein を豚胃粘膜粥で終局分解を行ひ調製した材料であるが、之は非賦活膵液でも稍分解されて居る。

* 化學研究所講演集、第6輯、71頁。

Cystein を以つて賦活性を試験したが全く陰性であつた。

以上の観察より家兎膵液中には Trypsin は非活性の状態にあり、小腸粘膜 Kinase に依り賦活され始めて、蛋白分解能を発揮するものである。此成績は Le Breton 氏⁽⁴⁾の犬膵液に就いて観察する所と一致するのである。(第1表第2表)

第1表 家兎膵液に依る蛋白消化試験
(4 ccm 消化液の酸値増加, ccm n/10 NaOH)

基 質	酵 素 液	時間	PH				
			6.0	7.0	7.5	8.0	9.0
Casein (1 %)	膵 液	8	0	0	0.03	0.01	—
		24	0	0.05	0.05	0.01	—
		72	0	—	0.19	0.04	—
	膵液 Kinase 液賦活	8	0.52	0.55	—	0.57	—
		24	0.70	1.67	—	0.66	—
		72	0.74	1.68	—	0.66	—
	膵液 Kinase 粉賦活	8	—	—	0.77	0.70	—
		24	—	—	0.92	0.80	—
		72	—	—	1.29	0.99	—
	膵液 Cystein 賦活	8	0	0	—	-0.01	—
		24	0	0.04	—	0.04	—
		72	0	0.25	—	0.15	—
Gelatine (1 %)	膵 液	8	—	—	0.02	—	—
		24	—	—	0.10	—	—
		72	—	—	0.20	—	—
	膵液 Kinase 液賦活	24	0.27	0.32	—	0.30	—
		144	0.42	0.40	—	0.37	—
	膵液 Kinase 粉賦活	8	0.12	0.35	0.50	0.53	0.49
		24	0.18	0.58	0.63	0.66	0.65
		72	0.37	0.75	0.90	0.98	0.75

第2表 家兎膵液に依る蛋白消化試験 (PH 8.0)
(4 ccm 消化液の酸値増加, ccm n/10 NaOH)

基質 時間	Casein		Methylcasein		Ovoalbumin (E. Merck)		Serumalbumin (E. Merck)		Pepton (Casein 製)	
	非賦活	賦 活	非賦活	賦 活	非賦活	賦 活	非賦活	賦 活	非賦活	賦 活
5	0.03	0.70	0	0.25	0.01	-0.04	0.01	-0.01	0.06	0.32
24	0.05	0.80	0	0.37	0.01	0.01	-0.01	-0.01	0.15	0.52
72	0.19	0.99	-0.01	0.37	0.02	0.13	0	0.01	0.34	0.62

第一報に報告した所の膵潰浸液中の活性 Trypsin 作用の發現は、潰浸操作に依り非活性 Trypsin が賦活されたものと考えられる、その原因機作は不明であるから、目下非賦活膵液の賦活性に就いて研究して居るので、他日の報文に詳述したい。

2) 非賦活膵液又賦活膵液を以つて、Diglycin, dl-Leucylglycin, Glycyl-dl-phenylalanin (α), dl-Leucyldiglycin, dl-Leucylglycyl-dl-phenylalanin (β) 等の分解試験を行ひしが、何れも水解作用を認めず、其結果家兎膵液中には Dipeptidase 又 Aminopolypeptidase 作用を認めない事になる。Waldschmidt-Leitz 氏⁽³⁾は犬膵液中に微弱ながら Erepsin 作用を認めて居るが、Le Breton 氏⁽⁴⁾は犬膵液中 Peptidase 作用の存在を否定して居る。

家兎脾臓浸液中に Dipeptidase 作用を証明した事は第一報の通りであるが、之は臓器組織中に存在して居る組織 Peptidase 作用と見る可きであると考へる。(第3表)

第3表 家兎脾液に依る Dipeptide 及び Tripeptide の分解試験

(4 ccm 試験液の酸値増加, ccm n/10 NaOH)

基 質	酵 素 液	時間	PH			
			7.0	7.5	8.0	8.5
Diglycin	脾 液	5	—	0(7.8)	—	0.02
		24	—	0	—	0
		72	—	0	—	0
	脾液 Kinase 液賦活	5	—	0(7.8)	—	—
		24	—	0.02	—	—
		72	—	0.02	—	—
	脾液 Kinase 粉賦活	5	—	0.05	—	—
		24	—	0.05	—	—
		72	—	0.16	—	—
dl-Leucylglycin	脾 液	5	—	0(7.8)	—	0.06
		24	—	0	—	0.06
		72	—	0	—	0.03
	脾液 Kinase 液賦活	24	—	0(7.8)	—	—
		72	—	0	—	—
Glycyl-l-phenylalanin(α)	脾 液	5	—	0.02	—	—
		24	—	-0.01	—	—
		72	—	-0.03	—	—
dl-Leucyldiglycin	脾 液	5	—	0.02	—	—
		24	—	-0.01	—	—
		72	—	-0.03	—	—
	脾液 Kinase 液賦活	5	0	0.02	0	—
		24	0	-0.01	0	—
		72	0	-0.03	0	—
dl-Leucylglycyl-dl-phenylalanin(β)	脾 液	5	—	0.04	—	—
		24	—	0.02	—	—
		72	—	0.01	—	—

3)最後は遊離 Carboxylgruppe を水解條件として考へられる、所謂 Carboxypolypeptidase に就いての試験である。

Benzoylderivate 及び Phtalylderivate は非賦活又賦活如何に拘らず全部陰性である。その一部は脾臓浸液に關する前報告でも陰性なので、一層明確と考へる。脾液中には Histozyim の存在を證明出来なかつた。

内野氏⁽⁷⁾は豚脾臓浸液 Trypsinfraktion 中に Benzoyl- 又 Phtalylderivate 分解能を認めて居るが、家兎の場合は異なる成績である。

河合氏⁽⁸⁾の犬脾液の Benzoyl-dl-leucyl-glycin 分解陽性成績と異り、家兎脾液中には之を認める事が出来なかつたが、其浸液中には陽性成績を得たので、或は脾液中のものが減力されたのかも知れない。(第4表)

次に Bromisocapronylderivate が又全部陰性成績を示したるに對し、Chloracetylaminosäuren はよく水解されて居る。賦活又非賦活液何れも陽性である。

Chloracetyl- β -phenylalamin は殆んど分解されて居らない。 β -Aminosäuren 含有 Dipeptide

第4表 家兔膵液に依る Acylpeptide の分解試験

(4 ccm 試験液の酸値増加, ccm N/10 NaOH)

(2 ccm 試験液, $\text{NH}_2\text{-N}$ 増加, $\text{NH}_2\text{-N}$ mg)

基 質	酵 素 液	時間	PH					
			5.0	6.0	7.0	7.5	8.0	9.0
Benzoylglycin	膵液 Kinase 粉賦活	5	—	0	0	—	0	0
		24	—	0	0	—	0	0
		72	—	0	0	—	0	0
Benzoyldiglycin	膵液 Kinase 粉賦活	5	0	0	-0.03	—	-0.05	-0.05
		24	0	-0.01	0.01	—	-0.02	-0.05
		72	0	-0.05	0.01	—	0.02	-0.01
Benzoyl-dl-leucyl-glycin	膵液 Kinase 液賦活	5	—	—	—	0.01	—	—
		24	—	—	—	0	—	—
		72	—	—	—	0	—	—
	膵液 Kinase 粉賦活	5	—	—	—	0	—	—
		24	—	—	—	0.01	—	—
		72	—	—	—	0.01	—	—
Phtalyldiglycin	膵液	5	—	—	—	0	—	—
		24	—	—	—	1.03	—	—
		72	—	—	—	0.03	—	—
	同 上	5	—	—	—	0 ($\text{NH}_2\text{-N}$ mg)	—	—
		24	—	—	—	0.001	—	—
		72	—	—	—	0	—	—
	膵液 Kinase 粉賦活	5	—	—	—	0.07	—	—
		24	—	—	—	0.10	—	—
		72	—	—	—	1.10	—	—

が Dipeptidase 作用に抵抗あるのと同じ現象かも知れない。⁽⁸⁾

Halogenacyldrivat は容易に Halogen を遊離するので特に $\text{NH}_2\text{-N}$ を定量した。又煮沸水中三十分加熱した非活性酵素を使用した場合、 $\text{NH}_2\text{-N}$ の増加を認めない対照試験をも特に掲げた。

然し Chloracetyldiglycin の分解陰性成績は豫想外であつた。

茲に注意すべき點は Bromisocapronyllderivate は家鶏組織⁽⁹⁾では分解される基質であるが、家兔膵液では分解されない結果であつた。

家兔膵液では Chloracetylaminosaüren のみがよく分解されると言ふ結果になつて、この點は家兔膵液中に活性 Carboxypolypeptidase の存在を肯定するのであるが、その作用はアミノ基被覆 Peptide 全般と言ふ解でなく、餘程限定された意味のものと考へる。豚膵潰浸液中などのかゝる分解酵素作用はかなり廣範なアミノ基被覆基質に就いても分解能を発揮する様である。(第5表)

實 験 部

1) 家兔膵液採集. 家兔を脊位固定し、開腹後十二指腸部の腸間膜を注意して脂間に張延し視ると、膵管経路を認める。此膵管十二指腸開口部より僅に隔りたる部位を注意して切開し、毛細硝子カニューレを挿入結束して、其の他端を消毒試験管内に導入す。自製 Sekretin 液注射に依り、多き時は 10 ccm 以上の澄明膵液を採集す。少量 Tolnol を上層して氷室に貯へ使用す。

2) 消化試験. 基質溶液の調製法又濃度は第一報の場合と同じ。基質溶液 20 ccm に就き 10

第5表 家兔膵液に依る Halogenacylpeptide の分解試験
(1 又 2 ccm 試験液の増加, $\text{NH}_2\text{-N}$ mg)

基 質	酵 素 液	時間	PH			
			5.0	6.0	7.0	8.0
Bromisocapronyl-glycin	膵液 Kinase 粉賦活	5	0	-0.001	-0.003	—
		24	0.002	0	-0.001	—
		72	0.003	-0.016	-0.016	-0.015
	膵液 Kinase 液賦活	24	—	—	—	-0.003
Bromisocapronyl-diglycin	膵液 Kinase 粉賦活	5	—	—	0.001	—
		24	—	—	-0.001	0.001
		72	—	—	0.027	0.024
Chloracetyl-l-tyrosin	膵液 Kinase 液賦活	24	—	—	—	0.046
		120	—	—	—	0.050
Chloracetyl-dl-phenylalanin	膵液 Kinase 粉賦活	5	—	—	—	0.093
		24	—	—	—	0.115
		72	—	—	—	0.098
	膵液 Kinase 液賦活	5	—	—	0.047	0.021
		24	—	—	0.102	0.126
		72	—	—	0.156	0.175
	膵 液	5	—	—	—	0.263
		24	—	—	—	0.288
		72	—	—	—	0.287
	膵液 Kinase 粉賦活 煮沸水中加熱	5	—	—	—	-0.001
		24	—	—	—	-0.028
		72	—	—	—	-0.011
Chloracetyl-dl-phenylalanin (β)	膵 液	5	—	—	—	-0.003
		24	—	—	—	-0.003
		72	—	—	—	0.001
	膵液 Kinase 粉賦活	5	—	—	—	0.035
		24	—	—	—	0.035
		72	—	—	—	0.032
	膵液 Kinase 粉賦活 煮沸水中加熱	5	—	—	—	-0.018
		24	—	—	—	-0.003
		72	—	—	—	-0.012
Chloracetyldiglycin	膵液 Kinase 粉賦活	5	—	—	—	0
		24	—	—	—	-0.010
		72	—	—	—	-0.006
	膵液 Kinase 液賦活	5	—	0.011	0.017	-0.006
		24	—	0.006	0	-0.004
		72	—	-0.005	-1.003	-0.016

又 20 倍稀釋(時として 5 倍)膵液 2 又 4 ccm を加へ、Tolnol 上層の許に 37° に消化す。

賦活法は、膵液原液 1 ccm に就き 0.1 又 0.05 g Kinase 粉の割に、又は 5 倍稀釋膵液に之と等量 Kinase 液を加へ室温(15°—22°) 30 分放置賦活す。

Kinase 粉又 Kinase 液の調製法は第一報の如くす。

本試験消化一定時の後、其消化液 4 ccm に就き Formoltitration にて酸値を、又 2 ccm (時として 1 ccm) に就き Van Slyke 法にて $\text{NH}_2\text{-N}$ を定量す。

對照試験としては基質無き、酵素液調節液混合を本試験と同條件に消化せしめた。

表には、試験直後定量値及び對照試験定量値を引去りたる増加酸値を n/10 NaOH ccm にて又増加 $\text{NH}_2\text{-N}$ を mg にて示し、分解値とせり。

總 括

1) 家兔膵液中には非活性 Trypsin (inaktiv) 存在し、小腸粘膜 Kinase に依り賦活され、活

性 Trypsin となりて蛋白分解能を發揮す。

2) Pepton は非賦活脾液に依りても一部分解され、賦活脾液に依り著明に分解さる。

3) Albumin (E. Merck) は家兔脾液(賦活又非賦活)に分解されず。

4) 家兔脾液中には Dipeptidase (Diglycin, Leucylglycin, Glycylphenylalanin) 又 Tripeptidase (Leucyldiglycin, Leucylglycyl- β -phenylanin) 作用を認めず。

5) 家兔脾液中には Histozyim 無し。

6) 家兔脾液中には Chloracetylaminosäuren の分解能を認むるも, Benzoylpeptide, Phthalyl-diglycin 又 Bromisocapronylaminosäure 又 dipeptid の分解能を證明せず。

Chloracetylaminosäuren にして β -アミノ基を有するものは α -アミノ基に比し酵素作用に抵抗ある成績を見た。

(第9回大阪講演會に於て發表)

文 獻

- (1) E. Walschmidt-Leitz u. A. Purr, Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 62, 2217 (1929).
- (2) J. Northrop, Ergebnisse der Enzymforschung, 1, 302 (1932).
- (3) E. Walschmidt-Leitz u. J. Walschmidt-Graser, Zeits. f. Physiol. Chem., 166, 247 (1927).
- (4) Le Breton u. F. Mocorrea, Ann. physiol. physicochim. biol., 7, 215 (1933).
- (5) T. Kawai, J. of Biochem., 10, 277 (1929).
- (6) T. Imai, Zeits. f. physiol. Chem., 136, 173 (1924).
- (7) S. Utzino, J. of Biochem., 9, 483 (1928).
- (8) S. Utzino, Zeits. f. physiol. Chem., 198, 135 (1931).
- (9) 内野仙治, 吉岡政七, 島津和雄, 化學研究所講演集, 第5輯, 159 (1935).